

既存の薬剤の磁性強度をスクリーニングし、その中から特に磁性強度の高い物質を見出している。

目的

抗がん剤は両刃の剣であり、癌組織を殺すこともできるが、正常組織にもダメージを与えて副作用を引き起こし、癌患者は抗がん剤の副作用で死ぬことがある。もしも癌組織だけに抗がん剤を狙い定めることができ（たとえば磁石を用いて）、正常組織には行かないようにできれば、抗がん剤による副作用を軽減できる。つまり磁場を用いたDDSが可能となる。

横浜市立大学循環制御医学講座は「薬を磁性化する技術」（薬が磁石にくっつくようにする）を持ち、この技術の開発と応用は横浜市立大学循環制御医学講座の石川義弘教授と外部企業の物理学者が長年開発してきた研究テーマであり、すでに多数の独占的技術特許を生み出している（国際特許出願を含めて9件）。この技術および研究成果を癌治療薬への応用を目的とし、「安心安全の医療開発」および「大学の研究成果の社会還元」を理念として本研究は開始された。

活動内容

私は、活動開始以前から既にこの磁性を有する化合物の抗がん効果を細胞培養系において確認しており、目的の磁性化合物を培地中に添加後、培養皿の一点に磁石で誘導した時、磁石の近傍磁界に存在する細胞の増殖抑制を確認した。そこで、増殖抑制メカニズムを解明するために、9種の細胞株（メラノーマ、前立腺癌、肉腫など）に対する増殖抑制効果を細胞培養系にて明らかにし、磁性化合物がアポトーシスを誘導することを明らかにした。同時に確立した腫瘍モデルマウスを利用して目的の磁性化合物が磁場誘導により腫瘍細胞に集積されることを、MRIやESRで検出するとともに、抗がん効果として腫瘍の有無とサイズを肉眼的、および病理学的に解明する為の研究が進んできている。

1) 増殖抑制メカニズムの解明

培養細胞系において磁性化合物による細胞傷害性を、MTTアッセイによる細胞数の計測により評価した。1mg/ml Poly-L- Lysine (Wako, 大阪) で24時間コートした24穴プレートに、各細胞を1穴当たり 2×10^4 個播種した。R3327-MAT-Lu, R3327-AT2.1, R3327-AT6.1, VX2, SK-MEL-24, Pos-1, AJ750を37°C、5% CO₂条件下で24時間培養し、R3327-G, Clone M3を48時間培養した。磁性化合物刺激群として1.8 μM, 3.6 μM, 7.5 μM, 15 μM, 30 μMの磁性化合物で細胞を刺激した。この時に対照群として10 μMの磁性化合物類似構造体で刺激した。R3327-AT2.1, R3327-AT6.1, VX2, SK-MEL-24は12時間、R3327-MAT-Lu, R3327-G, Clone M3, Pos-1, AJ750は24時間の刺激後、MTTアッセイを行った。

また、磁性化合物によるDNA断片化の検討をDNAのニックを検出するTUNEL法にて行った。各細胞を8穴ガラスチャンバースライド（ヌンクインターナショナル、東京）の各穴に 1×10^4 個播種し、24時間培養後、1.8 μM, 3.6 μM, 7.5 μM, 15 μM, 30 μMの磁性化合物で24時間刺激し、その後核染色を行い蛍光顕微鏡にて無作為に12視野を選び3000-5000個の細胞数を計測し、アポトーシスの割合を測定した。

MTTアッセイによる細胞数の計測によって磁性化合物の細胞傷害性を検討した結果、前立腺癌細胞株では、磁性化合物の感受性が高い細胞株と感受性が低い2種類の細胞株の存在が明らかになった。R3327-MAT-Lu (MAT) と R3327-G (G) は磁性化合物感受性細胞株であり、生細胞率が50%であるIC₅₀値は、MATで4.37-6 μM、Gでは8-9 μMであり、1.8-30 μMの磁性化合物で

24 時間刺激した時、濃度依存的に生細胞率が減少した。さらに、その細胞傷害性が磁性化合物の類似構造体の影響でない事を明らかにするため、 $10\mu\text{M}$ の類似構造体での影響を検討した。この結果、MAT では 95.5%、G では 87.9% の生細胞率が確認され、類似構造体による有意な生細胞率の減少は認められなかった。一方、R3327-AT2.1、R3327-AT6.1 に対し、 $1.8\mu\text{M}$ - $30\mu\text{M}$ の磁性化合物では 80% 以上の生細胞率が確認され、この濃度域における細胞傷害性は認められなかった。

さらに、Clone M3、VX2、Pos-1、AJ750 細胞では磁性化合物の感受性が認められた。しかし、SK-MEL-24 では磁性化合物感受性は認められなかった。Clone M3、VX2、Pos-1、AJ750 の IC_{50} 値は、それぞれ $40\text{-}50\mu\text{M}$ 、 $5\text{-}6\mu\text{M}$ 、 $12.5\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ であったことから、AJ750 が最も高い磁性化合物感受性細胞株である事が明らかになった。さらに、 $10\mu\text{M}$ の類似構造体での刺激により、Clone M3、VX2、Pos-1、AJ750 での個々の生細胞率は 90%、99.65%、88.73%、83.09% であり、類似構造体による有意な生細胞率の減少は認められなかった。

加えて、DNA 断片化を検出する目的で TUNEL を行った結果、濃度依存的に TUNEL 陽性細胞数は増加した。また、DAPI の核染色の結果、核の多形化や異型化が観察された。

2) 腫瘍モデルマウスにおける磁性化合物の磁場誘導の検討

生理食塩水で調製した磁性化合物をラット及び、マウスの尾静脈より投与 ($50\text{mg}/\text{kg}$) し、磁場印加 (650mT) によりマウスの尾に磁性化合物を集積させた。具体的には直径 20mm の平面をもつ円柱形のネオジウム磁石 (650mT) をマウスの尾に固定し、10 分毎に 5mm ずつ移動して計 6 回移動の後、1 回目に局所集積していた部位に戻り同方向に再び 6 回移動する方法で計 3 時間磁場を印加した。

磁性化合物投与後、磁場印加後に切断したマウスの尾を 4%PFA にて 4°C で 17 時間固定し、自動固定包埋装置とパラフィン溶解/包埋装置を用いてパラフィンブロックを作製した。滑走式 (ユングの) ミクロトーム (Leica Microsystems Japan, 東京) で尾組織表面を削ぎ、 65°C の条件でパラフィンを除去した。続いてレモゾール A で尾組織内のパラフィンを溶解し各 2 時間 (3 回)、100% エタノールで 1 時間 (2 回)、70% エタノールで 1 時間浸水させ、超純水で洗浄した。その後、特殊染色液で反応させた結果、強磁場な部位に顕著な陽性反応が検出された。そこで、上記の方法を用いて Clone M3 細胞をマウス尾の皮下に移植して作製した腫瘍モデルを用い、磁性化合物 ($50\text{mg}/\text{kg}$) を静脈より投与後、磁場印加による薬剤送達を 12 日間行ったところ一様な腫瘍の縮小効果を認めた。

磁性化合物は、磁性体であるため MRI での薬剤送達の検出が可能である。そこで、動物に移植した腫瘍への磁場印加によって、送達された磁性化合物を検出するために MRI 撮影を行った。MRI 撮影は NMR (AV300M&AV400M デジタル NMR) (ブルカー・バイオスピン株式会社、茨木) を用いて $T1 : \text{TE}/\text{TR}=8.2/700\text{ms}$ 、 $T2 : \text{TE}/\text{TR}=12.5/2000\text{ms}$ 、 $T2^* : \text{TE}/\text{TR}=8/200\text{ms}$ の条件で行った。具体的にはマウス尾に磁場を印加後、 $150\text{mg}/\text{kg}$ の磁性化合物を静脈投与して局所集積させた。対照群として同時刻にマウス尾静脈から生理食塩水を投与した群と、先述と同濃度の磁性化合物をマウス尾静脈より投与後、磁場印加を行わない群を作製した。局所集積後、尾を結紮し切断後、

切断面を接着剤で止血した。撮影の為に、マウス尾をプラスチック板に固定して1.5%アガロースゲルで包埋後、撮影した。その結果、磁性化合物のファントム像からは、T1とT2のどちらの条件でも同様な撮影像が得られた。また、緩和時間は磁性化合物の0-1.25mg/mlの濃度範囲でT1:TE/TR=8.2/700ms、T2:TE/TR=12.5/2000ms、T2*:TE/TR=8/200msを決定した。また、磁性化合物はT2強調で低調な信号として検出された。上記の撮影条件下で、150mg/kgの磁性化合物を1回尾静脈よりマウスに投与し、移植した腫瘍への磁場印加によって磁性化合物を集積させ、MRI撮影を行った結果、特にT2*の撮影像で印加磁束密度が最も高い領域と接触させた腫瘍部位に顕著な低調な信号を観察することが出来た。

今後さらに磁性化合物を開発を進めて行くためには、磁性化合物の単結晶構造解析等を終了させ、構造の改良を行わなければならないなど課題は多い。細胞系の実験結果より、他の抗癌剤同様、細胞種によっては磁性化合物の感受性が認められなかったことから、その原因を解明する必要もある。また、磁性化合物が他の抗癌剤と併用した場合に相加・相乗効果が見られるので、磁性化合物を担体として利用する事で、DDSの他、結合した薬剤との相加、相乗作用による効果的な癌治療薬として利用可能であると考ええる。

現在実験に使用している永久磁石は、一般に使用されている磁石と比較すると強力であるが、動物実験で使用した永久磁石の磁束密度ではマウス深部癌へのDDSは困難であることが明らかになっており、臨床応用には、安全に使用でき、深部癌に薬剤を送達可能な磁石の開発も必須であると考えられ、これらの開発については外部の大学の磁場の専門家と共同研究という形で協力を得て、横浜市立大学病院の整形外科により臨床的な立場からの意見を取り入れながらの研究が現在進められている。

7. 当該年度の流動研究員期間中に学会誌等に発表した論文(Publication List)

なし

第一原理計算による有機機能材料の解析

Analysis of Organic Functional Materials by First Principles Calculations

江口 晴 樹 技術開発本部基盤技術研究所応用理学研究部 主幹 博士 (工学)

石川 義 弘 横浜市立大学大学院医学研究科 教授 医学博士

ニュージャージー州立大学医学部客員教授・同大学附属病院指導医

物理化学で標準的に使われている第一原理計算を有機機能材料分野に適用した。最初に自律神経調整薬、フォルスコリン誘導体の活性評価を行い、負の静電ポテンシャルが薬剤探索の期間短縮に重要であることを明らかにした。次に、磁場誘導ドラッグ・デリバリー・システムに用いる有機磁性体の解析と実証実験を行った。本解析で見いだした EI236 は、磁場誘導可能な抗がん剤として機能するだけでなく MRI 造影剤としても機能する。第一原理計算による材料解析技術は、有機機能材料の分野にも適用可能である。

First principles calculations, such as the standard method of designing functional materials, are applied to an organic functional material. Firstly, activity evaluations of an autonomic nerve controlled drug, such as forskolin derivatives, can be predicted by the distribution of the negative electrostatic potential of each derivative. The method can dramatically shorten drug screening time. Secondly, an organic magnetic material for the magnetic targeted drug delivery system is identified through first principles calculations. Our identified compound, such as EI236, acts as both an anti-tumor drug and an MRI contrast medium, and has pharmacological effects that can be delivered in a controlled manner. Therefore, materials analysis technology using first principles calculations can be also applied to organic functional materials.

1. 緒 言

すべての原子は原子核とそれを取り巻く電子から構成されており、材料の性質は電子の分布とそのエネルギー状態によって決定される。そのため、電気を通す、または光を発する有機機能材料などの特殊な機能をもった材料開発では、それらの機能を十分に発揮させるため原子レベルから材料設計を行うことが重要である。したがって、従来の経験的な方法に代わり量子力学が有効なツールとなる。なぜなら、材料の電気的特性、磁性、光学特性などを支配する原理は原子レベルの世界を記述できる量子力学だからである。

上記の方法は物理化学の世界では標準になっている第一原理計算と呼ばれ、実験パラメータなどを一切参照せずに物質の特性を解析する方法である。しかし、量子力学の基本方程式であるシュレディンガー方程式を直接解くことは困難であるため近似法を用いる必要がある。私たちが身近に接する材料は 1 モル程度の数 (たとえば 10^{23} 個) の原子核とそれを取り囲む電子から構成され、物質構造や性質はこれらの電子の運動状態によって支配される。しかし、 10^{23} 個の原子を取り巻く電子状態をすべて知る必要はない。シュレディンガー方程式に近似を導入することによって、注目する電子とそれ以外の全電子とすべての原子

核がつくる場を考えることができる。これは、密度汎関数法と呼ばれ、1998 年に W. Kohn がこの理論の提唱と発展でノーベル化学賞を受賞している。当社ではこのような機能材料の探索と改良を効率的に行うため、密度汎関数法に基づく第一原理計算に基づき硬質材料の設計、次に熱電材料、発光素子、光触媒に取り組んできた。本方法はもともと無機機能材料と呼ばれている分野を中心に使われている方法であったが、コンピュータの能力向上とアルゴリズムの高速化によって最近では計算する原子数が多い有機機能材料の分野でも使われるようになり始めた。本稿では有機機能材料分野の解析の一例としてコンピュータ解析の導入が最も進んでいる創薬分野への適用について述べる。

新薬開発プロセスにおいては、迅速かつ低コストで、候補化合物の検索をしていくことが鍵である。特に、特定のリードコンパウンド (新薬) がすでに存在する場合、それを基に多数の類似化合物を合成し、その活性をさらに比較検討することによって、より効果の高い化合物 (改良新薬) を決定していくことになる。製薬企業にとって、改良新薬の開発は、独自の開発よりは低リスクであるが、多大なる開発コストが必要になる。これは現在の改良新薬スクリーニングにおいて、数百におよぶ改良新薬の候補化合物を実際にスクリーニングしなければならないか

らである。そこで、数百におよぶ改良新薬候補化合物を、共通特性に応じて 10 分の 1 以下に短縮できれば、スクリーニングの速度は 10 倍に加速されると考えられる。したがってその共通特性をどのような解析方法によって決定するか、あるいはそのような解析方法が存在するかという問題があった。これらの問題を解決するため第一原理計算を用いて酵素蛋白を制御する化合物であるフォルスコリン誘導体の活性評価の解析を行った。

次に、磁場誘導によるドラッグ・デリバリー・システム (DDS) に必要な有機磁性体の探索と発見した有機磁性体の評価試験を実施した。薬の投与においては、体全体すなわち患部だけではなく健全なところにも作用するため副作用が発生する可能性がある。この問題の解決策の一つとして、薬を患部にだけ選択的に運搬して作用させる手法、DDS がある。DDS が実現すれば、現在は副作用が大きくて使用が難しい薬も、安全に使用できる可能性が高まり、さらに薬剤を患部へ効果的に運び、かつ薬剤濃度を局所的に高めることで薬理効果を向上することができる。磁場誘導による DDS の研究は古く約 30 年前から行われている。従来の DDS は薬と担体であるキャリア (例えば、ナノサイズの微粒子に薬を混合したもの) のシステムであるが、分子サイズの巨大化、あるいはキャリアと薬との結合性や親和性に問題があった。そこで、キャリアを使わず、かつ薬効を落とさない DDS を検討し、有機磁性薬について解析的検証と新規候補剤の分子設計を試みた。可能性が出てきたのでその成果について報告する。

2. 自律神経調節薬 (フォルスコリン誘導体) の活性評価⁽¹⁾

フォルスコリンはインド地方にあるシソ科の植物である。古代ヒンズー医学書には心臓病、呼吸疾患、腹痛、排尿病、また不眠やひきつけなどの中枢神経系の病気にも効果があるとされている。近年になってこの生薬はアデニル酸シクラーゼと呼ばれる酵素蛋白質に結合することで活性化する⁽²⁾ことが分かってきた。石川ら⁽³⁾は、フォルスコリンの生理活性の向上と疎水性から親水性へ性質を変えるため側鎖修飾を行い、それらを「心不全治療薬」、「やせ薬」などへの開発を行っている。従来の方法は酵素蛋白とその制御化合物の相互作用を古典的な方法 (多数の化合物をランダムに合成し、それを酵素反応実験でスクリーニング) で検索することを行い、得られた計算結果をもとに、コンピュータで立体構造を解析し、化合物と酵

素蛋白とのフィッティング・シミュレーション (ドッキング・シミュレーションとも呼ばれる) によって、リードコンパウンド (新薬) の決定を行ってきた。

ところがこれらの方法では、初期リードコンパウンドの決定は行えるが、そこからさらに複数の類似化合物の合成を行い、より有効な化合物 (改良新薬) を検索するプロセスは極めて困難である。これは現在の創薬プロセスの共通問題点であり、標的酵素蛋白を効果的に制御し得る化合物は、どのような化学的あるいは構造的共通特性があるかを検討する方法の開発が必要とされている。

これに対して、標的酵素蛋白の結晶立体構造を利用したコンピュータ・フィッティングの技術が浸透しつつあるが⁽³⁾、これは立体構造からの解析であり、かならずしも正確な予測が可能ではない。なぜなら標的酵素蛋白と目的化合物の相互作用の近似が十分でないからである。したがって改良新薬の開発においては、コンピュータ・フィッティングの有効性が限定されるという欠点がある。改良新薬の候補化合物を同定するに当たっては、従来と異なった手法の導入が必要とされている。

従来法では種類の異なるアデニル酸シクラーゼを選択的に刺激し活性化することで自律神経を調節するためのフォルスコリン側鎖の同定は可能であるが、側鎖修飾の種類解析には不適であった。そこで化学的な側鎖修飾が異なる場合、これらの間にどのような共通性があるのかを第一原理計算で行った。静電ポテンシャルの分布、HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) と LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) の波動関数分布、福井関数の分布を調べた結果、静電ポテンシャルがフォルスコリン誘導体の薬理活性に大きく影響を及ぼしていることが明らかになったので報告する。

本研究で用いた第一原理計算はすべて密度汎関数法によるものである。電子とイオンの相互作用についてはすべての電子を考慮する全電子法 (All electron method) を用いている。波動関数はスピン分極型の線形結合型の原子軌道 (Linear Combination of Atomic Orbitals : LCAO) で分極関数を追加した 2 重数値基底関数 (Double Numerical basis-set including Polarization function : DNP) を使用し、計算精度を損なうことなく計算速度の高速化をするため上記基底関数のカットオフは 0.4 nm に設定している。交換相互作用項は、Becke, Lee, Yang, Parr^{(4),(5)}によるものを用い、使用ソフトはアクセルリス社の DMol3⁽⁶⁾を用いた。

計算を行ったフォルスコリン誘導体の化学構造式を第1表に示す。アデニル酸シクラーゼは構造と機能が異なる9種類のサブタイプが存在し肺の自律神経の制御に関係している酵素蛋白をII型アデニル酸シクラーゼと呼び、それを選択的に刺激し活性化する化合物としてFD1とFD2を解析した。同様に嗅覚の自律神経の制御に関係しているIII型アデニル酸シクラーゼを刺激し活性化する化合物としてはFD3とFD4、心筋の自律神経の制御に関係しているV型アデニル酸シクラーゼを刺激し活性化する化合物としてはFD5とFD6を解析した。

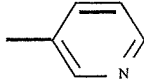
9種類あるサブタイプのアデニル酸シクラーゼの中から特定のものを識別し酵素反応を起こすフォルスコリン誘導体の活性度、すなわち特異性を調べるため、フォルスコリン誘導体の静電ポテンシャルを計算した。静電ポテンシャルは負の電荷と正の電荷で表される。たとえば、正の電荷部分をもつフォルスコリン誘導体は負の電荷部分をもつアデニル酸シクラーゼと結合する。

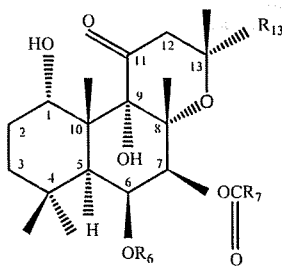
静電ポテンシャルの等電位面を第1図に示す。正の等

電位ポテンシャルは青色、負の等電位ポテンシャルは黄色であらわされている。図示した電位面は正の等電位ポテンシャルは -5.880×10^{-4} eV、負の等電位ポテンシャルは -5.880×10^{-4} eVである。

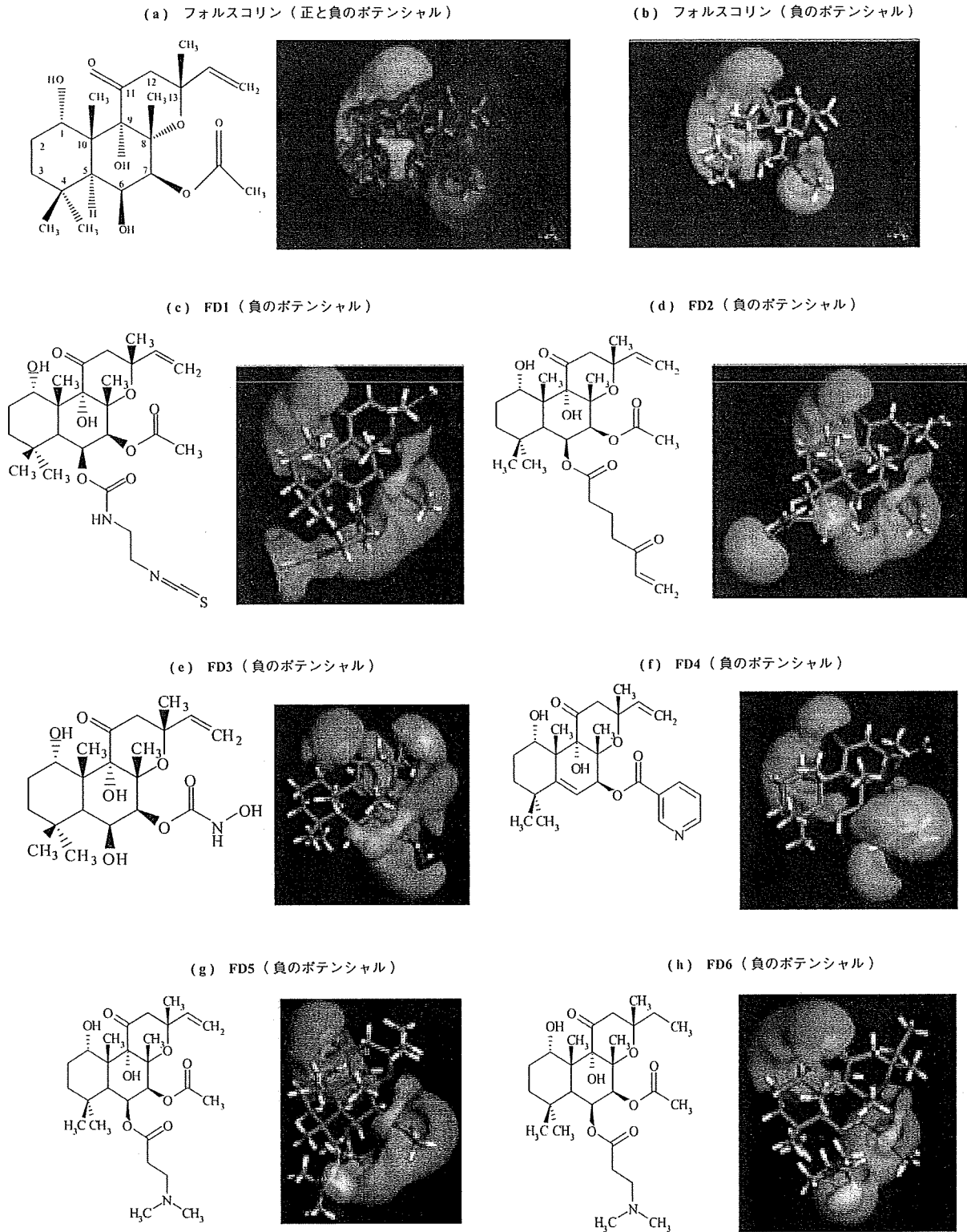
第1図-(a)にあるように計算したすべてのフォルスコリン誘導体の正の静電ポテンシャルは分子全体に広がるのが特徴であり、負の静電ポテンシャルは二つの領域に分かれているのが特徴である。正の静電ポテンシャルについてはどのフォルスコリン誘導体についても同じであった。これは正の静電ポテンシャルがアデニル酸シクラーゼの選択性に影響を与えていないことを示唆する。しかし、負の静電ポテンシャルについては大きく異なることが明らかになった(第1図-(c)~(h))。たとえば、II型のアデニル酸シクラーゼを刺激するFD1とFD2の負の静電ポテンシャルは第1図-(c)、-(d)にあるC6、C7(第1図-(a)の化学構造式の6員環の内側にある数字を指す)の裏側に広がっているのが特徴である。しかし、C7部分の表側に少し分布しているのも特徴である。これは、II

第1表 フォルスコリン誘導体の化学構造式
Table 1 Chemical structure of forskolin and its derivatives

化合物名	位 置			選択性
	R ₆	R ₇	R ₁₃	
Forskolin	H	CH ₃	CH=CH ₂	無
FD1	CONHCH ₂ CH ₂ NCS	CH ₃	CH=CH ₂	Type II AC
FD2	COCH ₂ CH ₂ CH ₂ COCH=CH ₂	CH ₃	CH=CH ₂	Type II AC
FD3	H	NHOH	CH=CH ₂	Type III AC
FD4	5,6-dehydroxy		CH=CH ₂	Type III AC
FD5 NKH477	COCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₃	CH=CH ₂	Type V AC
FD6	COCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₂ CH ₃	Type V AC



(注) 本文使用したフォルスコリン誘導体の側鎖のR₆, R₇, R₁₃の略語は表に示しているとおりである。
 FD1, 6-[N-(2-isothiocyanatoethyl) aminocarbonyl] forskolin;
 FD2, 6-(4-acrylbutyl) forskolin;
 FD3, 7-deacetyl-7-hydroxamylforskolin;
 FD4, 5,6-dihydroxy-7-deacetyl-7-nicotinoylforskolin;
 FD5, 6-[3-(dimethylamino) propionyl] forskolin (NKH477);
 FD6, 6-[3-(dimethylamino) propionyl]-14,15-dihydroforskolin.
 R₆, R₇, R₁₃の各位置は表の下の化学構造式のとおりである。



第 1 図 フォルスコリンとその誘導体の静電ポテンシャル図
 Fig. 1 Isosurface of electrostatic potential of forskolin and its derivatives

型アデニル酸シクラーゼの正の静電ポテンシャルと FD1 と FD2 の C6, C7, R₇ の裏側と相互作用していることを意味している。III 型のアデニル酸シクラーゼを刺激する

FD3 と FD4 は第 1 図 - (e), - (f) にあるように負の静電ポテンシャルは C7 の全体を覆うように広がっている。これは III 型アデニル酸シクラーゼの正の静電ポテンシャル

が FD3 および FD4 の C7 の位置と相互作用していることを意味している。V 型のアデニル酸シクラーゼを刺激する FD5 と FD6 の負の静電ポテンシャルは第 1 図-(g), -(h)にあるように C8 と C7 の裏側に大きく広がり, C6 の位置には広がりが少ない。したがって V 型アデニル酸シクラーゼの正の静電ポテンシャルは FD5 と FD6 の C7, C8 と相互作用をすることを意味する。

これらの結果, フォルスコリン誘導体の負の静電ポテンシャルは各サブタイプ型のアデニル酸シクラーゼの正の静電ポテンシャルと相互作用することでその特異性をもつことが分かった。本評価に費やした時間は 3 か月であり, 従来法⁽³⁾の 5 年と比較してフォルスコリン誘導体の活性評価時間を大幅に短縮した。

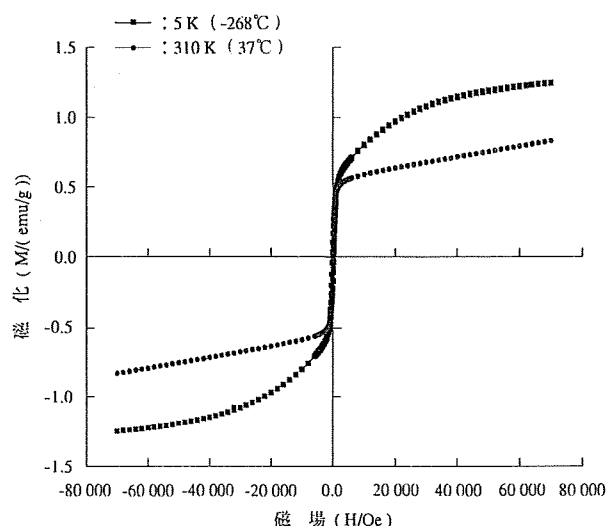
3. 磁場誘導ドラッグ・デリバリー・システムに用いる有機磁性体の解析と実証実験⁽⁷⁾

世の中に存在する物質は原子から構成され, その原子は原子核と電子からなる。その電子一つはこまのように回転しており, 左回りの時は上が N 極, 下が S 極 (これを上向きスピン電子状態という), そして右回りの時は上が S 極, 下が N 極 (これを下向きのスピン電子状態という)となる。したがって電子 1 個単独で存在する場合は磁石としての機能をもつ。しかし, 共有結合等のように, 上向きのスピン電子と下向きのスピン電子の二つの電子がそろった場合は電子がもつ磁石の性質を打ち消し合うことになり磁石としての性質を失う。多くの有機化合物は, 共有結合を中心に構成されているため, 上向きのスピン電子と下向きのスピン電子はそろい, 結果として電子の磁石としての性質は失われ, 磁石にくっつかなくなる。たとえば, 我々の身近にあるプラスチック材料などが磁石にくっつかないのはこの理由である。したがって, 磁石にくっつくような有機化合物を設計するにはスピン電子の電子状態を制御する必要がある。具体的には, 物理の言葉では同じ方向のスピン電子のみを局所的にそろえる。化学の言葉ではラジカル電子を分子中に安定に存在させることが有機磁性体の設計の指導原理である。我々は第一原理計算によって対を組まない電子 (すなわち安定ラジカル電子) をコンピュータによって数える方法⁽⁸⁾を開発した。本方法を用いて有機磁性体の探索を行い, 超伝導量子干渉素子 (SQUID: Superconducting Quantum Interface Devices) を, Quantum Design 社 (アメリカ) の MPMS (Magnetic Property Measurement System) を用いて「磁場—磁化曲

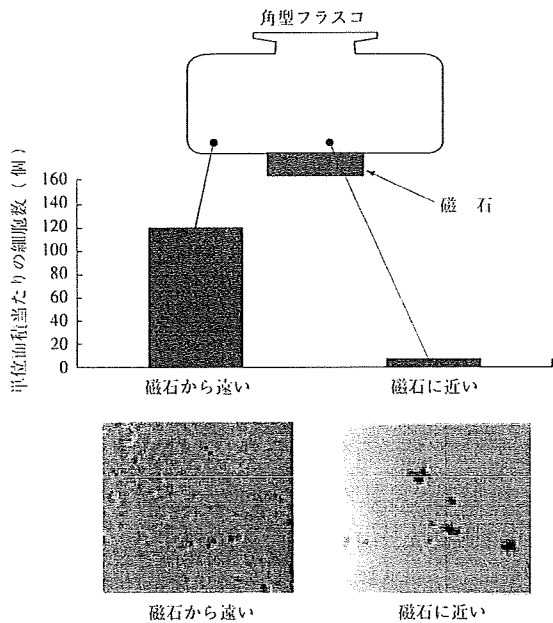
線」を測定したところ DNA 切断剤と呼ばれる抗がん剤の中に $-268 \sim 37^{\circ}\text{C}$ まで強磁性体の特徴であるヒステリシスループをもつ有機磁性体 (EI236)⁽⁹⁾を見いだした (第 2 図)。磁場誘導 DDS の可能性が出てきたので, EI236 を用いて次の生化学実験を行った。

ラットの筋肉のがん細胞である L6 細胞が 30%培養容器の培養面を覆う (コンフルエント) の状態になった時に EI236 の粉末を均等にふりかけた後, フラスコ横底面にネオジウム永久磁石を設置し 48 時間後に培地の状態を観察した。第 3 図の上側はラット L6 細胞の培地がある角型フラスコに棒磁石を接触させた状態を示している。次いで, 48 時間後角型フラスコ底面の一端から他端までを撮影し, 細胞数を算出した結果を第 3 図の中央に示す。第 3 図の中央における磁石に近いとは, 角型フラスコ底面における磁石端面を示し, 磁石から遠いとは, 角型フラスコ底面において磁石端面と反対側にある領域を示す。第 3 図に示すように, 磁石から近いでは EI236 が引き寄せられて EI236 の濃度が増し抗がん作用によって細胞数が遠位よりも極端に低いことが分かる。したがって, EI236 は磁石を用いて誘導が可能で, 磁石近位の部分の薬剤濃度を高くすることでがん細胞の増殖を防ぐことが可能であることが分かった。

次に, 薬剤を動物に投与して MRI で撮影を行った。第 4 図は, 9 週齢のメスのラット (日本 SIC 製 ddy) 用い, これに, 磁性をもつ EI236 を溶液に溶解したもの (濃度 5 mg/ml) を皮下注射によって投与した後, 脂肪, ガドリウム造影剤などで高信号が得られる撮影モードである T1



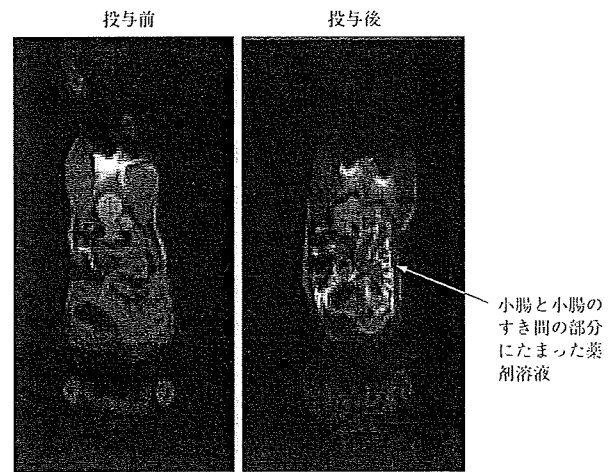
第 2 図 EI236 の「磁場—磁化」曲線測定結果
Fig. 2 Magnetic field versus magnetization curve of EI236



第3図 がん細胞 (L6細胞) の磁場誘導実験
Fig. 3 Magnetic target experiment of cancer cell (L6)

強調のMRI画像である。EI236を投与すると投与前に比べて臓器と臓器のすき間や腹腔膜に沿って造影効果が見られた。矢印の部分は小腸と小腸の隙間の部分に溜まった有機磁性体であり、本EI236が体内で白く光る陽性造影剤であることが分かった。

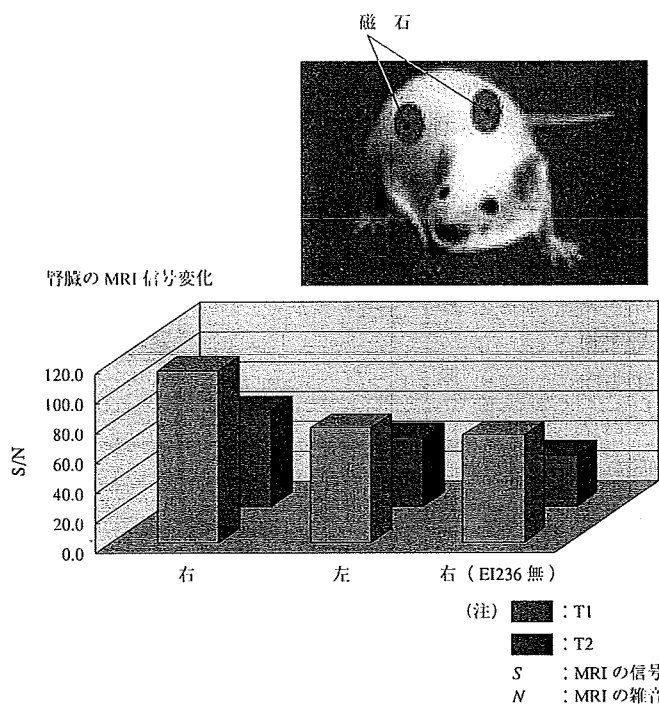
さらに、磁場でEI236の簡易磁場誘導実験を動物で行っ



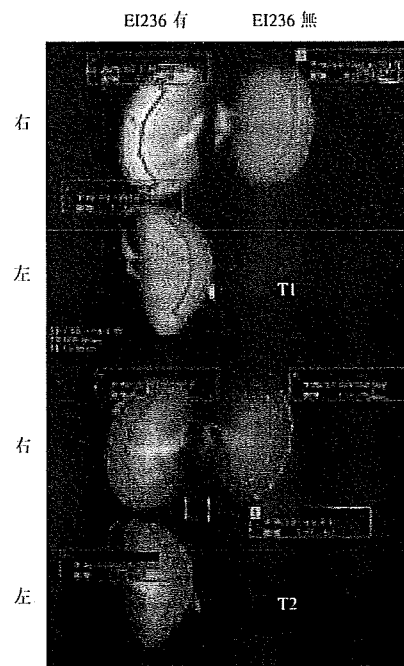
第4図 EI236のMRI造影効果確認試験
Fig. 4 MRI imaging of EI236

(left hand side: before administration, right hand side: after administration)

た。上記と同様のラットの下大静脈から濃度 5mg/ml で 0.2 ml 静注し 10 分後、ラットから腎臓を摘出し MRI 造影実験を行った。第5図に腎臓のMRI造影剤実験結果をしめす。T1強調画像で見たところ、右側の腎臓のT1強調のMRI信号は左側と比較して約35%程度増加しており、ネオジウム永久磁石を当てた右側の腎臓にEI236が集積していることが分かった。一方、血液、関節液などで高信号が得られるMRI撮影モードであるT2強調画像で



第5図 EI236のMRI造影効果確認試験 (腎臓のMRI信号変化)
Fig. 5 MRI imaging of EI236 (MRI signal change of kidney)



は、MRI 信号の変化は見られなかった。

4. 結 言

第一原理計算による有機機能材料分野の解析の一例として創薬分野への適用を行った。

自律神経調節薬（フォルスコリン誘導体）の活性評価については、フォルスコリン誘導体のアデニル酸シクラーゼのサブタイプ特異性が正の静電ポテンシャルではなく負の静電ポテンシャルにあることを見いだした。本方法を用いれば、アデニル酸シクラーゼの各サブタイプを選択的に刺激し活性化する薬剤、すなわち自律神経調節薬のスクリーニングが従来の5年から約3か月に短縮されることを明らかにした。

また磁場誘導ドラッグ・デリバリー・システムに用いる有機磁性体の解析と実証実験では、第一原理計算に基づき強磁性体を見いだす独自の評価法⁽⁸⁾を考案した。次にその評価法を用いることでEI236を見いだし、実証実験の結果EI236は37°Cにおいても強磁性体の性質をもっていることを明らかにした。さらに生化学実験を行ったところ、EI236は、磁場誘導DDSが可能な抗がん剤として機能し、さらにMRI造影剤としても使用の可能性があることが分かった。最近では、上記のような有機磁性薬の探索だけではなく、市販薬の側鎖を改変することによって磁性をもたせることにも成功している。

第一原理計算による材料解析技術は、コンピュータ解析の導入が最も進んでいる創薬分野にも適用可能であることを実証した。

— 謝 辞 —

東北大学大学院理学研究科物理学専攻 電子物理学講座 ナノネットワーク固体物理研究室 谷垣勝己教授には「磁場—磁化」曲線の測定、横浜市立大学医学部循環制御医学研究室的の皆さんには生化学実験についてご協力をいただいたことをここに記し、深く感謝します。

参 考 文 献

- (1) H. Eguchi, K. Iwatsubo and Y. Ishikawa : Isoform-Selective Regulation of Adenylyl Cyclase by Forskolin Derivatives Prediction of Selectivity by Computer-Based Analysis Letters in Drug Design & Discovery Vol. 4 (2007) pp. 434 - 441
- (2) Y. Ishikawa and C. J. Homcy : The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction Circ. Res. Vol. 80 (1997) pp. 297 - 304
- (3) T. Onda, Y. Hashimoto, M. Nagai, H. Kuramochi, S. Saito, H. Yamazaki, Y. Toya, I. Sakai, C. J. Homcy, K. Nishikawa and Y. Ishikawa : Type-specific regulation of adenylyl cyclase Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms J Biol Chem Vol. 276 (2001) pp. 47 785 - 47 793
- (4) A. D. Becke : Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior Phys. Rev. A Vol. 38 (1988) pp. 3 098 - 3 100
- (5) C. Lee, W. Yang and R. G. Parr : Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density Phys. Rev. B Vol. 37 (1988) pp. 786 - 789
- (6) B. Delley : An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules J Chem Phys Vol. 92 (1990) pp. 508 - 517
- (7) Haruki Eguchi, Koji Otsu, Reiko Kurotani and Yoshihiro Ishikawa : Identification of Magnetic anti-tumor drug -its usage in drug delivery and MRI- Proceedings of 52nd Conference on Magnetism and Magnetic Materials (2007. 11) p. 307
- (8) IHI : 特願 2007-170909 (現在スーパー早期審査中) 江口晴樹, 石川義弘
- (9) IHI : 特願 2007-338928 江口晴樹, 石川義弘

新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用

研究代表者：横浜市立大学 石川 義弘

研究目的：

エレクトロニクスの材料分野を中心として、有機磁性体の研究開発が進んでいる。かつて磁性体は無機化合物のみであると考えられていたが、80年代より多数の有機磁性体化合物の発見や合成が進んでおり、実用化に向けた検討が進められている。我々は材料分野の研究に用いられてきた、物理学的な計算手法である第一原理解析法を駆使することにより、有機化合物に磁性を予測する方法を開発した。本手法を用いることにより、医療、とりわけMRIを中心とした画像解析に有用であると考えられる有機化合物を中心に、磁性予測を行い、MR画像診断における「機能を有する造影剤」として開発し、新規画像診断技術として開発していくことが目的である。

方法および結果：

第一原理解析法はこれまで超伝導材料やエレクトロニクス材料の開発に用いられてきた手法であり、この手法の応用により、有機化合物に磁性を予測することが可能となった。この磁性予測技術を用いて、医薬材料化合物の磁性予測を行った。さらに解析精度を上げるために様々な計算手法を導入すると共に、実際の化合物合成を行い、その磁性を測定することにより、我々の磁性解析法を改善していった。これまで3年間の試行錯誤の結果から、単に磁性を予測するだけでなく、磁性を設計し、既存の非磁性体化合物を磁性化する手法を開発することが出来た。このことは既存の薬理化合物に対して磁性化設計を行い、新規磁性薬理化合物として再開発できることを意味する。

我々の同定した磁性有機化合物のひとつに、抗がん作用を有するものがある(EI236)。我々はこの化合物の抗がん剤としての薬理作用を検討すると共に、磁性特性を用いた磁場による誘導作用、交流磁場賦課による発熱作用を検討すると共に、磁性特性によるMRIにおける造影効果を検討した。

EI236はマグネタイトに匹敵する磁性を有することが磁場磁化曲線から明らかとなった。極低温から37度にいたるまで、幅広い温度帯において強磁性を示すことがわかった。またEI236は薬理効果としての抗腫瘍作用を持つことがわかった。悪性黒色腫細胞をはじめとして、様々ながん細胞に対して腫瘍増殖を抑制することが判明した。抗腫瘍効果はDNAに直接作用し、がん細胞の細胞死を誘導するメカニズムが示唆されている。

またEI236を培養がん細胞に添加し、磁石で誘導することによって、抗がん作用自体が誘導されることがわかった。このことは、EI236自身が磁場誘導され、抗がん作用が同時に誘導されたことを示す。同様の実験を、マウス尾部に発生させた悪性黒色腫において検討した。EI236を全身投与し、尾部に永久磁石を当てることによって、EI236を悪性黒色腫局所に誘導した。コントロール群、EI236全身投与群、EI236全身投与+磁場誘導群の3群において治療効果の比較を行ったところ、磁場誘導群において顕著な腫瘍の縮小および退縮が認められた。

以上の性質を持つEI236がMR造影剤として機能するかを検証するために、ファントム実験および動物モデルにおいて造影効果を検討した。ファントム実験においては様々な環境設定を行い、同化合物のMRシグナルが濃度依存的に上昇することを確認した。さらにT1およびT2などの測定の諸条件の検討を行った。これにより単なるファントムのみならず組織中においても濃度依存的にMRシグナルが上昇することがわかった。これらの検討結果を元に、前述の尾部腫瘍モデルにおいて、マウスに同化合物を経静脈的に全身投与した後に、永久磁石を尾部腫瘍に作用させたところ、マウス尾部に同化合物が集積し、MRシグナルの増強として造影できることを証明した。これらの結果から、EI236は磁場によって誘導可能な抗がん剤であり、MRの造影剤として機能することがわかった。

考察：

本研究プロジェクトの目的である有機磁性体のMR造影剤の開発に際して、E I 2 3 6 がファントム実験および動物実験によってMR造影剤として作用することが実証された。このことは、薬理的な機能(抗がん効果)をもつ有機磁性体化合物が、薬理的効果を発揮すると同時に、MRにおける造影機能を示すことを証明したことになる。ファントム実験等から、濃度測定が可能であることがわかっており、これは抗がん剤の局所集積量を定量出来ることを意味する。抗がん剤の局所における定量は、これまで実現されたことは無く、MR画像診断としての応用のみならず、抗がん剤治療の開発にも大きな進歩をもたらす可能性がある。さらに、同様の薬剤開発によって今後の薬物治療と画像診断にも大きな影響を及ぼす可能性がある。

Drug Delivery System Using Magnetic Materials

島田 千恵美

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学

Abstract

A drug delivery system (DDS) to deliver a drug when and where required is a powerful tool for reducing the doses of drugs administered and the side effects. Isolation of candidate materials and development of a new DDS using the materials should provide a more powerful tool in the medical field. Therefore, we are developing a new DDS using a combination of candidate magnetic materials and a magnetic field.

Introduction

Surgical therapeutic, chemotherapeutic and radiotherapeutic approaches alone or in combination have been used for treatment of cancer¹⁾. However, each approach has side effects such as nausea, vomiting, anorexia, diarrhea, alopecia and hepatic dysfunction²⁾⁻⁵⁾. Many studies aimed at the development of a DDS to solve the problems of side effects of cancer therapies have been carried out over past three decades^{6),7)}. We have isolated novel magnetic materials to solve the problems of side effects of cancer chemotherapy and have studied a DDS using a novel magnetic material. Here, we introduce our study and other target-selective DDSs.

Drug Delivery Systems

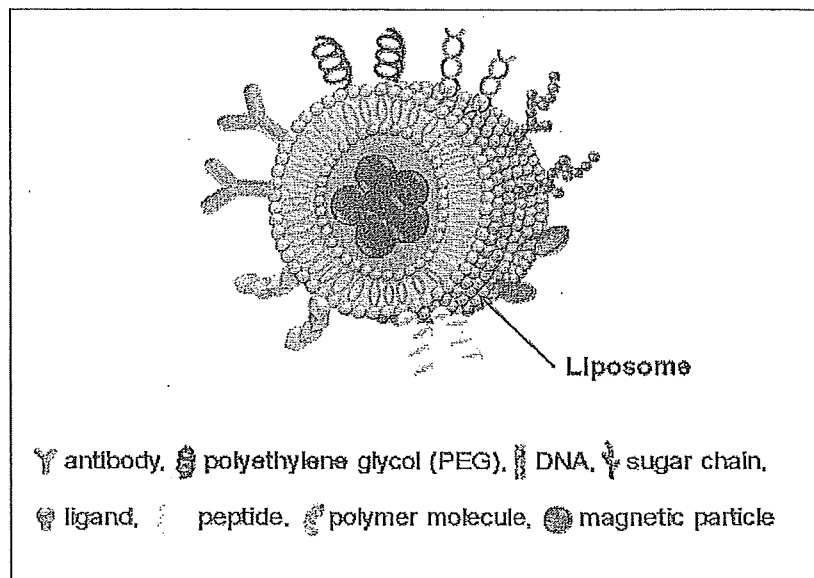
DDSs have been developed to enable drugs to safely elicit effects in target organs, tissues or cells. DDSs can be classified into 1) target-selective drug delivery systems⁶⁾⁻¹¹⁾, 2) controlled-release drug delivery systems¹²⁾⁻¹⁴⁾, 3) systems for drug delivery by absorption^{15),16)}. Target-selective drug delivery systems for delivering drugs to target organs, tissues and cells are expected to greatly reduce side effects in normal cells. Much interest has been shown in the use of liposomes for target-selective DDSs.

Since liposomes are composed of lipid bilayer membranes, they can contain both aqueous and lipophilic drugs, and the surfaces of liposomes can also be modified by the addition of a specific antibody, a certain ligand, polymers, and so on^{10),11)} (Scheme). A controlled-release DDS and a system for drug delivery by absorption have been developed and produced as an implantable infusion pump and a skin patch, respectively by Johnson and Johnson Company (Alza Corporation)^{11), 17), 18)}

Furthermore, the use of magnetic materials in the development of DDSs has been reported in the 1970s and accumulation of albumin microspheres containing doxorubicin and magnetite (Fe_3O_4) in a sarcoma by a permanent magnet led to

regression and disappearance of the sarcoma⁶⁾.

In the 1980s, liposomes containing magnetite (magnetic liposome) were developed, and accumulation of these liposomes by the use of an electronic magnet was tested in an animal study⁷⁾. Magnetic liposomes have been improved and their anticancer effects under an alternative current magnetic field have been demonstrated in animal studies¹⁹⁾. We have been attempting to isolate novel magnetic materials that also have biological properties such as cytotoxicity. Magnetic materials that also have biological properties will be useful for improving DDSs, which should lead to reduction in side effects in the near future.



Schematic illustration of liposome for a DDS. A liposome can contain probes (DNA plasmid, siRNA, virus vector) and magnetic particles.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare and New Energy and Industrial Technology Department Organization (NEDO) of Japan and the Magnetic Health Science Foundation.

References

1. Recht A, Come SE, Gelman RS, Goldstein M, Tishler S, Gore SM, Abner AL, Vicini FA, Silver B, Connolly JL, Schnitt SJ, Coleman CN, Harris JR. Integration of conservative surgery, radiotherapy, and chemotherapy for the treatment of early-stage, node-positive breast cancer: sequencing, timing, and outcome. *J Clin Oncol*. 9 (9) : 1662-7, 1991
2. Schnell FM. Chemotherapy-induced nausea and vomiting : the importance of acute

- antiemetic control. *Oncologist*. 8 (2) : 187-98, 2003
3. Morse MA. Supportive care in the management of colon cancer. *Support Cancer Ther*. 3 (3) : 158-70, 2006
 4. Zidan J, Haim N, Beny A, Stein M, Gez E, Kuten A. Octreotide in the treatment of severe chemotherapy-induced diarrhea. *Ann Oncol*. 12 : 227-9, 2001
 5. Kornek GV, Ulrich-Pur H, Penz M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Kovats E, Lang F, Schneeweiss B, Scheithauer W. Treatment of advanced breast cancer with vinorelbine and docetaxel with or without human granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol*. 19 (3) : 621-7, 2001
 6. Widder KJ, Morris RM, Poore G, Howard DP Jr, Senyei AE. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci*. 78 (1) : 579-81, 1981
 7. Kiwada H, Sato J, Yamada S, Kato Y. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting device for drugs. *Chem Pharm Bull*. 34 (10) : 4253-8, 1986
 8. McBain SC, Yiu HH, Dobson J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomedicine*. 3 (2) : 169-80, 2008
 9. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lübke AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res*. 60 (23) : 6641-8, 2001
 10. Cheong I, Huang X, Thornton K, Diaz LA Jr, Zhou S. Targeting cancer with bugs and liposomes : Ready, Aim, Fire. *Cancer Res*. 67 (20) : 9605-8, 2007
 11. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Review*. 4 : 145-60, 2005
 12. Chowdary KP, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*. 27 (11) : 1717-24, 2004.
 13. Kunisawa J, Okudaira A, Tsutusmi Y, Takahashi I, Nakanishi T, Kiyono H, Mayumi T. Characterization of mucoadhesive microspheres for the induction of mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*. 19 : 589-94, 2001
 14. Wang G, Tucker IG, Roberts MS, Hirst LW. In vitro and in vivo evaluation in rabbits of a controlled release 5-fluorouracil subconjunctival implant based on poly (D,L-lactide-co- glyco- lide). *Pharm Res*. 13 (7) : 1059-64, 1996
 15. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin : from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*. 34 : 203-22, 2008
 16. Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov Today*. 12 : 1061-7, 2007
 17. Yie W. Chien ; New developments in drug delivery systems. *Med Res Rev*. 10 (4) :

477-504, 1990

18. Widera G, Johnson J, Kim L, Libiran L, Nyam K, Daddona PE, Cormier M. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine*. 24 : 1653-64, 2005
19. Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat*. 113 : 435-441, 2009

